

王蕾,宋辉欠,李斌,等. 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化造模的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 29-38.

Wang L, Song HQ, Li B, et al. Effect of Western diet on APOE^{-/-} atherosclerosis model mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 29-38.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.004

西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化造模的影响

王蕾,宋辉欠,李斌,梁超,陈敏,田玉淑,吴旭颖,张文明,刘云波*

(北京华阜康生物科技股份有限公司,北京 102202)

【摘要】目的 为了研究西方饮食饲料快速建模及对 APOE^{-/-}小鼠生物学指标及组织病理学的影响。**方法** 用 48♀ 48♂ APOE^{-/-}小鼠、48♀ 48♂ C57BL/6J 进行了试验,分为 8 组,分别为 APOE^{-/-}普通繁殖料组(24♀ 24♂)和 APOE^{-/-}西方饮食饲料组(24♀ 24♂)、C57BL/6J 普通繁殖料组(24♀ 24♂)和 C57BL/6J 西方饮食饲料组(24♀ 24♂)。从 3 周开始饲喂,直到 20 周实验结束。实验结束后采集血清检测生化指标,分离主动脉做大体油红 O 染色及分析,主动脉根部做石蜡切片和 HE 染色。**结果** 西方饮食没有显著增加 APOE^{-/-}体重,但可以显著提高 APOE^{-/-}鼠的血脂指标、总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白,促进动脉粥样硬化斑块的形成,雄鼠适合主动脉大体斑块的造模,雌鼠适合主动脉弓根部斑块造模。**结论** 西方饮食饲料可以促进 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化造模,增加主动脉斑块面积比,缩短建模时间,提高建模的均一性。

【关键词】 APOE^{-/-}小鼠;西方饮食饲料;动脉粥样硬化;生化指标;建模

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0029-10

Effect of Western diet on APOE^{-/-} atherosclerosis model mice

WANG Lei, SONG Huiqian, LI Bin, LIANG Chao, CHEN Min, TIAN Yushu, WU Xuying, ZHANG Wenming, LIU Yunbo*
(Beijing HFK Bioscience CO., LTD, Beijing 102202, China)

【Abstract】 Objective To study the impact of a Western diet-type feed on biological indicators and histopathology in APOE^{-/-} mice. **Methods** Forty-eight female and 48 male APOE^{-/-} mice, and 48 female and 48 male C57BL/6J mice were divided into eight breeding groups: APOE^{-/-} breeding feed group, APOE^{-/-} Western dietary feed group, C57BL/6J breeding feed group, and C57BL/6J Western dietary feed group (24 male and 24 female mice per group). Mice were fed the respective diets from 3 weeks until the end of the experiment at 20 weeks. After the experiment, serum was collected for measurement of biochemical indicators. Aortas were removed for oil red O staining and gross examination and the aorta root was paraffin sectioned and stained with hematoxylin and eosin. **Results** A Western diet did not significantly increase body weight in APOE^{-/-} mice, but did significantly improve the blood lipid index and total cholesterol, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein levels, and promoted the formation of atherosclerotic plaques. Male mice were suitable for modeling gross aortic plaques while female mice were suitable for modeling aortic arch root plaques. **Conclusions** A Western diet can promote atherosclerosis in APOE^{-/-} mice, increase the aortic plaque area ratio, shorten modeling time, and improve modeling uniformity.

【基金项目】 国家实验动物资源库服务科技创新能力提升关键技术研究示范(2021YFF0702800)。

【作者简介】 王蕾(1978—),女,博士,研究方向:预防兽医学。E-mail: wanglei@hfkbio.com

【通信作者】 刘云波(1962—),男,研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: liyunbo@hfkbio.com

[Keywords] APOE^{-/-} mice; Western dietary feed; atherosclerosis; biochemical index; modeling

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

APOE^{-/-}小鼠是中国医学科学院实验动物研究所利用基因敲除技术对 C57BL/6J 小鼠的载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 基因进行敲除而得,北京华阜康生物科技股份有限公司于 2009 年引入。APOE 基因位于小鼠第 7 号染色体,该小鼠是对该基因的第 3 外显子进行敲除。APOE 是乳糜微粒 (CM)、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的重要组分,可调节胆固醇和脂蛋白代谢。同时, APOE 在调节蛋白结构、信号转导、氧化应激、脂质代谢等方面具有重要作用^[1]。

APOE^{-/-}小鼠表现高血浆胆固醇症,最早 3 月龄在近端主动脉出现纸质条纹,损伤严重程度随年龄增长而加剧,出现动脉粥样硬化 (AS) 病变的部位涉及多个血管,但以主动脉根为主^[1]。APOE^{-/-}小鼠基本涵盖了 AS 病变的整个过程,包括斑块形成等,而且在喂食高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 或西式饮食 (Western diet, WD) 时能够更快地推进病变发展^[1]。

APOE^{-/-}小鼠常作为动脉粥样硬化模型,其优点是在正常饲养条件下也可以产生复杂的血管病变,并且这些病变与人类 AS 病变具有可比性,发展过程类似于人类 II 型高脂血症^[2]。APOE^{-/-}小鼠也存在一些缺陷,人类 AS 病变过程中最为关键的蛋白是低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL),而 APOE^{-/-}小鼠血浆胆固醇主要受脂蛋白残粒运载并不是 LDL,而 APOE 蛋白还有其他功能,包括影响免疫、巨嗜细胞生理和脂肪组织生理功能,每项功能都对动脉粥样硬化有影响,使得分析具体发病机制复杂困难^[3]。由于上述特点, APOE^{-/-}小鼠还被用

于研究糖尿病、尿毒症、系统红斑狼疮合并动脉粥样硬化、银屑病和血脂异常综合症、神经退化性疾病、肾疾病等^[4]。

APOE^{-/-}小鼠自发出现血清血脂的指标紊乱,给予高脂饮食后进一步加重,但是因不同的高脂饲料配方及造模方式的不同,模型构建时间长短不一^[4]。有报道称给与西方饮食饲料喂养 12 周,可显著增加其血脂含量,在主动脉根部位置,管壁有增厚,斑块也有明显增多,表现出典型的动脉粥样硬化病理特征^[5]。本研究探讨我公司生产的西方饮食饲料,从 3 周饲养到 20 周对 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化造模的影响,为研究人员提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验动物均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供 [SCXK (京) 2019-0008]。随机分为 8 个试验组,每组 24 只, APOE^{-/-}普通繁殖饲料组 (雌雄各 24 只)、APOE^{-/-}西方饮食饲料组 (雌雄各 24 只)、C57BL/6J 普通繁殖饲料组 (雌雄各 24 只)、C57BL/6J 西方饮食饲料组 (雌雄各 24 只)。从 3 周开始饲喂,饲喂到 20 周。具体使用动物介绍见表 1。

以上动物在本公司 SPF 设施 G1 饲养 [SYXK (京) 2019-0022], 隔离环境的洁净度为 5 级标准,温度控制在 (24±2) °C,相对湿度 (50%±10%),换气次数每小时 20 次,明/暗照明周期为 12 h/12 h,动物自由采食与饮水。所有动物实验均经过北京华阜康实验动物伦理委员会审批确认符合动物伦理学要求和实验动物保护的相关规定 (HFK-AP-

表 1 本研究使用动物简介

Table 1 Introduction to the use of animals in this study

品系 Strain	性别 Sex	数量/n Number	微生物等级 Microbial level	周龄/week Age	体重/g Weight
C57BL/6J	♂	24	SPF	3	8.60±0.90
C57BL/6J	♀	24	SPF	3	8.40±0.80
C57BL/6J	♂	24	SPF	3	8.50±0.85
C57BL/6J	♀	24	SPF	3	8.45±0.70
APOE ^{-/-}	♂	24	SPF	3	9.32±0.43
APOE ^{-/-}	♀	24	SPF	3	7.67±0.56
APOE ^{-/-}	♂	24	SPF	3	9.42±0.63
APOE ^{-/-}	♀	24	SPF	3	7.60±0.41

20221116)。在实验中,动物饲养和实验过程中按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

西方饮食饲料是北京华阜康生物科技股份有限公司生产[京饲证(2019)06076],主要配方为每公斤饲料中酪蛋白 195 g、蛋氨酸 3 g、玉米淀粉 50 g、麦芽糖糊精 100 g、蔗糖 341 g、纤维素 50 g、玉米油 10 g、奶油 200 g、矿物质混合物 35 g、碳酸钙 4 g、微生物混合物 10 g、胆碱 2 g、胆固醇 1.5 g、抗氧化剂 0.04 g。普通繁殖饲料是北京华阜康生物科技股份有限公司生产[京饲证(2019)06076],主要配方为每公斤饲料中次粉 300 g、麸皮 100 g、鱼粉 70 g、酵母 10 g、豆粕 210 g、玉米 237 g、豆油 20 g 石粉和碳酸氢钙 35.2 g、矿物盐 2 g、赖氨酸和蛋氨酸 6 g、胆碱 4 g、微生物 1.2 g、食盐 4 g。

无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,64-17-5);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,1330-20-7);苏木素染液(北京永欣康泰科技发展有限公司,517-28-2);伊红染色(北京永欣康泰科技发展有限公司,17372-87-1);盐酸(国药集团化学试剂有限公司,7647-01-0);氨水(国药集团化学试剂有限公司,1336-21-6);环保型中性树胶(北京永欣康泰科技发展有限公司,NA)。希森美康生化仪(BX4000)及配套试剂;眼科剪(14381-43,F.S.T);显微镊、显微剪(WA3050,上海金钟);体式显微镜(ST2-ST,OLYMPUS CORPORATION,TOKYO,JAPAN);油红 O 染色液(Solarbio,Cat#G1260);扫描仪(Epson periection V370 photo,J232D);脱水机(武汉俊杰电子有限公司,JT-12S);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,JB-P7);病理切片机(德国徕卡,RM2235);冻台(武汉俊杰电子有限公司,JB-L7);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,KD-P);烤片机(常州国华电器有限公司,常州国华电器有限公司,DB-B2);烤箱(邦西仪器科技(上海)有限公司,101-1BS);倒置显微镜(日本尼康,Nikon Ci-S);成像系统(日本尼康,Nikon DS-U3)。

1.3 实验方法

1.3.1 20 周体重比较

饲喂到 20 周后,称量体重,比较西方饮食对 APOE^{-/-}小鼠和 C57BL/6J 小鼠体重的影响。

1.3.2 血生化检测

饲养到 20 周,各组动物用纸盒包装出车间,运输到公司实验室后,内毗采血,用 CO₂ 安乐死。血

液在室温放置 1 h,再放入 4 ℃ 冰箱 1 h。离心 3000 r/min 离心 10 min,分离血清。血清用希森美康生化仪(BX4000)检测乳酸脱氢酶(LDH)、胆碱酯酶(CHE)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHO)、尿酸(UA)含量。

1.3.3 主动脉大体油红 O 染色

取材:分离摘除脏器,在显微镜下小心剥离周围脂肪使整根血管暴露,劈开后取下(可短时间暂存在盐水中)。

染色:将血管浸在饱和油红 O 染色液中染色 15 min 后取出,用 75% 乙醇分化剥离血管外壁多余脂肪,使无斑块处接近于无色透明,然后将血管展开铺在载玻片上,10% 福尔马林中固定。

拍照:将固定好的血管在干净载玻片上重新展开铺平,使用扫描仪扫描采集图像。

分析:采集图像后,应用 Image-Pro Plus 图像分析软件分别记录斑块面积和血管整体面积,计算斑块比例/%=斑块面积/血管整体面积×100%

1.3.4 主动脉弓根部石蜡切片和 HE 染色

固定:用 10% 中性福尔马林溶液固定各组小鼠主动脉弓根部,每组固定 6 只主动脉弓根部。进行石蜡切片和 HE 染色。

制片:组织样本,取材 3 mm 厚,梯度乙醇脱水 70%、80%、95%、100% 各 30 min,二甲苯两瓶各 20 min,石蜡浸蜡两缸各 30 min,包埋,切片 4 μm,烤片。

染色:二甲苯(I)10 min;二甲苯(II)10 min;100%乙醇(I)5 min;95%乙醇(II)5 min;80%乙醇 5 min;自来水洗 5 min;苏木素染液染色 5 min;自来水洗 5 min;1%盐酸乙醇 3~5 s;自来水洗 30 s;1%氨水返蓝 10 s;自来水洗 3 min;蒸馏水洗 1 min;0.5%伊红染液染色 1 min;自来水洗 5 min;80%乙醇分化至合适(镜下观察);95%乙醇(I)10 s;95%乙醇(II)10 s;无水乙醇 5 min;二甲苯(I)5 min;二甲苯(II)5 min;环保型中性树胶封片。

1.3.5 主动脉弓根部斑块面积分析

使用 K-Viewer 软件打开 HE 病理图片,每张病理片按照 4× 截取主动脉根部图,按原文件名称命名,图片保存为 TIF 格式。使用 Image-Pro Plus 软件打开截取的 TIF 格式图片,Irregular AOI 框选主动脉

根部内壁斑块, Count and measure objects 计算斑块面积, 截屏保留数据。

1.4 统计学方法

数据采用软件 SPSS 25.0, 数值以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠体重的影响

由表 2 可以看出 8 组动物饲喂结束后 20 周时, 不同饲料对同一品系相同性别小鼠体重的影响。西方饮食饲喂可显著增加 C57BL/6J 雄鼠的体重($P<0.05$), 极显著增加 C57BL/6J 雌鼠的体重($P<0.01$); 但是对于 APOE^{-/-}小鼠没有显著增加体重。相同饲料不同品系, 相同性别小鼠体重比较, 普通繁殖饲料饲喂 APOE^{-/-}小鼠体重极显著大于普通繁殖饲料 C57BL/6J 小鼠($P<0.01$)。西方饮食饲料饲喂的 APOE^{-/-}小鼠体重和西方饮食饲料饲喂的 C57BL/6J 小鼠体重未见显著差异($P>0.05$)。

2.2 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠血生化指标的影响

由表 3 可知, 西方饮食饲料可以极显著增加 C57BL/6J 小鼠胆碱酯酶、C57BL/6J 雄鼠的高密度脂蛋白和直接胆红素($P<0.01$), 西方饮食饲料可以显著增加 C57BL/6J 小鼠白蛋白的含量($P<0.05$)。西方饮食可以极显著增加 APOE^{-/-}小鼠总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白, APOE^{-/-}雌鼠的乳酸脱氢酶、胆碱酯酶、谷草转氨酶, APOE^{-/-}雄鼠的总蛋白($P<0.01$)。普通繁殖饲料饲喂的 C57BL/6J 小鼠尿酸极显著高于西方饮食饲喂($P<0.01$), 普通繁殖饲料饲喂的 APOE^{-/-}雌鼠尿酸显著高于西方饮食组($P<0.05$), 普通繁殖饲料饲喂的 APOE^{-/-}雄鼠谷丙转氨酶和碱性磷酸酶显著高于西方饮食饲喂($P<$

0.05)。

相同饲料, 不同品系, 同性别比较, 可以看出在饲喂普通繁殖饲料和西方饮食饲料时, APOE^{-/-}与 C57BL/6J 小鼠生化的品系差异。对甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白, 进行进一步分析(相同饲料, APOE^{-/-}品系, 不同性别组差异)发现西方饮食组雄鼠 LDL 极显著高于雌鼠($P<0.01$), 雌鼠的 HDL 极显著高于雄鼠($P<0.01$), 雄鼠的 TG 显著高于雌鼠($P<0.05$), 雌鼠和雄鼠的 CHO 无显著差异。普通繁殖料组, APOE^{-/-}雌鼠和雄鼠比较上述 4 个指标均无差异($P>0.05$)。

2.3 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠主动脉斑块面积的影响

图 1 和图 2 显示了各组雌鼠和雄鼠主动脉大体 O 红染色的扫描图片, 从图片上可以看出西方饮食组可以显著增加 APOE^{-/-}小鼠的主动脉斑块面积/血管面积比。

从表 4 可以看到各组主动脉大体 O 红染色数据和分析结果, 通过分析主动脉大体油红 O 染色斑块面积与血管面积比, 普通繁殖饲料 APOE^{-/-}组比普通繁殖饲料 C57BL/6J 组斑块面积与血管面积比显著增加($P<0.05$), 西方饮食饲料 APOE^{-/-}组比普通繁殖饲料 APOE^{-/-}组, 斑块面积与血管面积比显著增加($P<0.05$)。而且相同饲料情况下雄性 APOE^{-/-}小鼠的主动脉斑块面积比血管面积更大。

2.4 各组主动脉弓根部石蜡切片和 HE 染色观察

8 个实验组每组 6 只做主动脉弓根部石蜡切片和 HE 染色, 观察各组主动脉弓根部斑块形成情况, 明显看出西方饮食饲料明显促进主动脉弓根部斑块的形成, 每组挑选 1 只照片拼图展示(见图 3), 箭头指向斑块。各组主动脉弓根部面积结果见图 4 和表 5。

表 2 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠体重的影响

Table 2 Effect of Western diet on body weight of APOE^{-/-} mice

类型 Types	20 周 C57BL/6J ♂ 体重/g Average weight of 20 weeks C57BL/6J ♂	20 周 C57BL/6J ♀ 体重/g Average weight of 20 weeks C57BL/6J ♀	20 周 APOE ^{-/-} ♂ 体重/g Average weight of 20 weeks APOE ^{-/-} ♂	20 周 APOE ^{-/-} ♀ 体重/g Average weight of 20 weeks APOE ^{-/-} ♀
普通繁殖料 Breeding feed	27.31 \pm 1.88	19.91 \pm 0.95	30.17 \pm 1.81 ^B	23.24 \pm 1.01 ^B
西方饮食饲料 Western dietary feed	28.98 \pm 2.31 ^a	23.03 \pm 1.45 ^A	30.16 \pm 1.98	24.06 \pm 1.59

注: 不同饲料对相同品系、相同性别体重比较, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$; 相同饲料对不同品系、相同性别体重比较, ^B $P<0.01$ 。

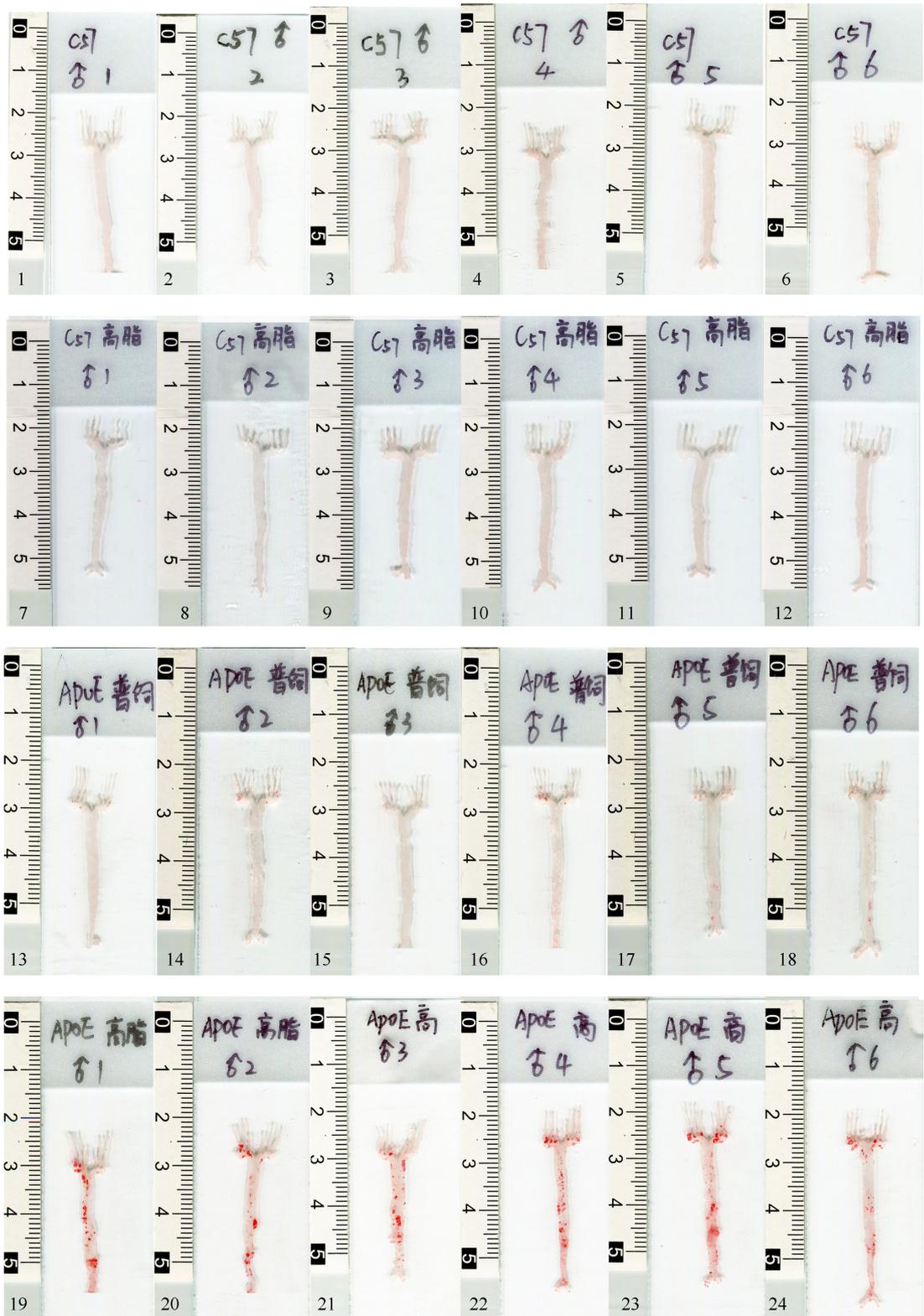
Note. Comparison of body weight of same strain fed with different feed same sex, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$. Comparison of body weight of different strain and fed with same feed of same sex, ^B $P<0.01$.

表 3 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠血脂化的影响
Table 3 Effect of Western dietary feed on blood biochemistry of APOE^{-/-} mice

组别 Groups	繁殖饲料 Breeding feed				西方饮食饲料 Western dietary feed			
	20 周 C57BL/6J ♂ 20 weeks	20 周 APOE ^{-/-} ♂ 20 weeks	20 周 C57BL/6J ♀ 20 weeks	20 周 APOE ^{-/-} ♀ 20 weeks	20 周 C57BL/6J ♂ 20 weeks	20 周 APOE ^{-/-} ♂ 20 weeks	20 周 C57BL/6J ♀ 20 weeks	20 周 APOE ^{-/-} ♀ 20 weeks
	20 周 C57BL/6J ♂ 20 weeks	20 周 APOE ^{-/-} ♂ 20 weeks	20 周 C57BL/6J ♀ 20 weeks	20 周 APOE ^{-/-} ♀ 20 weeks	20 周 C57BL/6J ♂ 20 weeks	20 周 APOE ^{-/-} ♂ 20 weeks	20 周 C57BL/6J ♀ 20 weeks	20 周 APOE ^{-/-} ♀ 20 weeks
乳酸脱氢酶/(U/L) LDH	793.27±99.79	667.01±84.47	782.87±141.05	673.74±58.27	696.03±252.97	483.15±102.55	949.17±256.59 ^b	1085.88±571.21 ^{AB}
胆碱酯酶/(U/L) CHE	4326.88±352.30	5677.04±640.62 ^D	5534.93±390.27 ^B	7581.70±787.21 ^{BD}	6596.88±715.22 ^A	8376.9±440.97 ^{AD}	6339.51±1885.78	9381.50±1914.37 ^{ABD}
低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL	0.25±0.06	0.34±0.06	4.35±0.63 ^B	5.19±0.83 ^B	0.43±0.07	0.41±0.05	15.04±5.52 ^{ABD}	10.96±1.87 ^{AB}
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL	1.75±0.19	1.34±0.23	2.79±0.29 ^B	2.89±0.34 ^B	2.87±0.98 ^{AD}	1.6±0.46	3.82±1.54 ^{AB}	5.26±1.25 ^{ABD}
总胆红素/(μmol/L) TBil	5.40±0.34	5.26±0.11	6.04±0.55	5.75±0.40	5.73±1.04	5.32±0.18	5.92±0.32	7.06±4.91 ^b
直接胆红素/(μmol/L) Dbil	4.49±0.92	5.14±0.15	4.54±0.37	4.68±0.34	5.73±1.07 ^{AB}	5.24±0.16	3.97±1.02	5.41±2.12 ^D
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	54.31±15.25	42.40±9.86	140.21±180.77 ^a	78.94±46.71	55.02±48.69	30.03±7.08	39.45±17.58	140.04±248.71 ^{bd}
谷草转氨酶/(U/L) AST	179.03±42.15	166.93±22.86	189.03±113.61	168.61±26.56	201.48±81.98	161.88±35.6	144.93±41.96	338.11±373.42 ^{ABD}
碱性磷酸酶/(U/L) ALP	115.29±12.98	184.71±24.43 ^D	166.93±22.98 ^{AB}	263.93±27.32 ^B	130.80±74.06	157.5±15.72 ^D	132.86±49.69	250.64±33.28 ^D
总蛋白/(g/L) TP	64.66±2.69	64.19±6.44	60.29±2.59	63.41±1.38	58.68±3.09	61.47±2.56	69.68±19.06 ^{AB}	69.31±4.07 ^b
白蛋白/(g/L) ALB	26.97±1.65 ^B	29.69±2.76 ^{AB}	22.14±1.61	25.68±1.09 ^d	29.64±1.73 ^a	32.61±1.49 ^{AD}	22.84±7.24 ^B	25.73±1.23 ^{BD}
总甘油三酯/(mmol/L) TG	1.06±0.14	1.18±0.20	1.22±0.38	1.17±0.21	0.94±0.20	0.98±0.1	1.37±0.54 ^{bd}	1.07±0.29
总胆固醇(mmol/L) CHO	2.55±0.3	2.13±0.38	12.38±1.68 ^B	14.35±2.40 ^B	4.72±1.39	3.63±0.38	37.46±11.44 ^{AB}	36.16±4.94 ^{AB}
尿酸/(μmol/L) UA	298.71±55.33 ^{AB}	307.14±66.58 ^{AB}	158.79±39.91	173.86±48.58 ^{BD}	144.30±14.29	56.7±21.1	151.21±60.13	125.86±40.31 ^B

注:不同饲料,相同品系,同性别比较, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$;相同饲料,不同品系,同性别比较, ^b $P<0.05$, ^B $P<0.01$;相同饲料,相同品系,不同性别比较, ^d $P<0.05$, ^D $P<0.01$ 。

Note. Compared between same sex mice and same strain of the different feed group, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$. Compared between same sex mice and same feed of the different strain, ^b $P<0.05$, ^B $P<0.01$. Compared between same strain and same feed of the different sex, ^d $P<0.05$, ^D $P<0.01$.

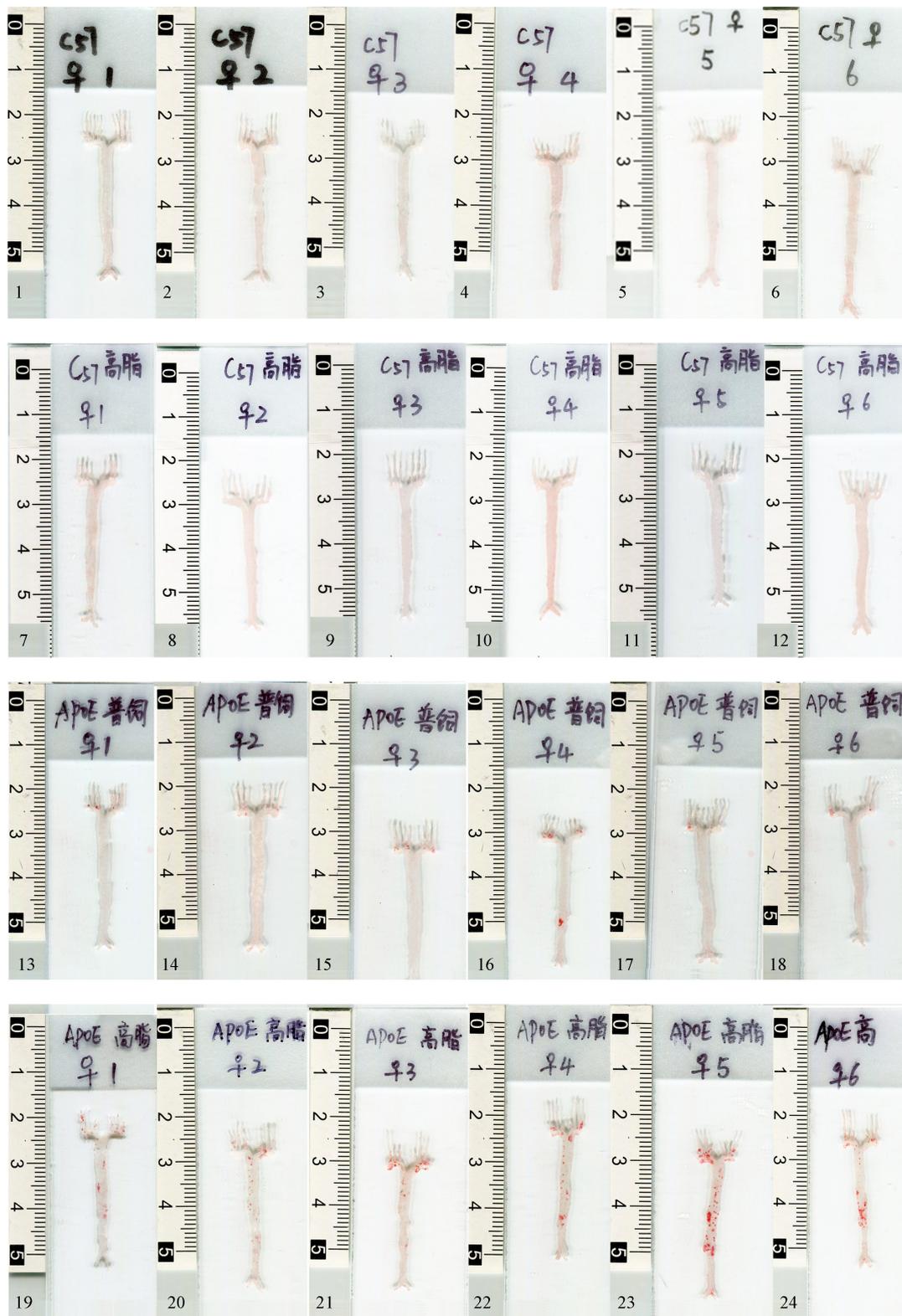


注:1~6:C57BL/6J 雄鼠普通繁殖料组;7~12:C57BL/6J 雄鼠西方饮食饲料组;13~18:APOE^{-/-} 雄鼠普通繁殖料组;19~24:APOE^{-/-} 雄鼠西方饮食饲料组。

图 1 各组雄鼠主动脉大体油红 O 染色

Note. 1~6, C57BL/6J male mice in the breeding feed group. 7~12, C57BL/6J male mice in the Western dietary feed group. 13~18, APOE^{-/-} male mice in the breeding feed group. 19~24, APOE^{-/-} male mice in the Western dietary feed group.

Figure 1 Macroscopic oil red O staining of the aorta of male mice in each group

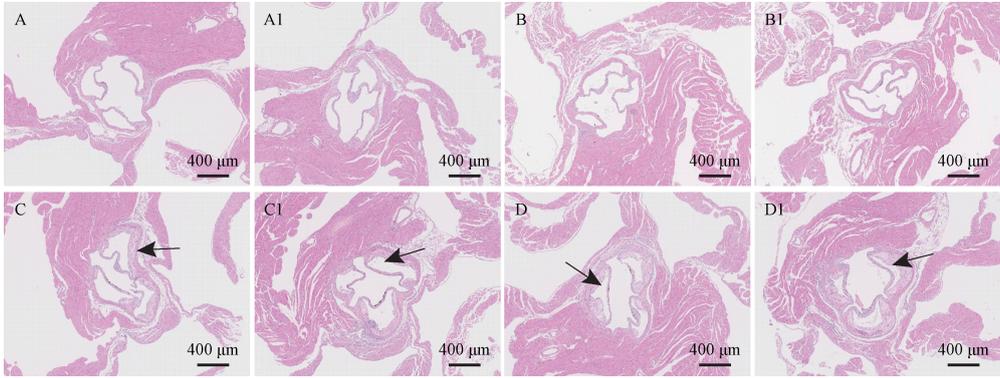


注:1~6:C57BL/6J 雌鼠普通繁殖饲料组;7~12:C57BL/6J 雌鼠西方饮食饲料组;13~18:APOE^{-/-} 雌鼠普通繁殖饲料组;19~24:APOE^{-/-} 雌鼠西方饮食饲料组。

图 2 各组雌鼠主动脉大体油红 O 染色

Note. 1~6, C57BL/6J female mice in the breeding feed group. 7~12, C57BL/6J female mice in the Western dietary feed group. 13~18, APOE^{-/-} female mice in the breeding feed group. 19~24, APOE^{-/-} female mice in the Western dietary feed group.

Figure 2 Macroscopic oil red O staining of the aorta of female mice in each group



注:A、A1: C57BL/6J 小鼠饲喂普通繁殖饲料; B、B1: C57BL/6J 小鼠饲喂西方饮食饲料; C、C1: APOE^{-/-} 小鼠饲喂普通繁殖饲料; D、D1: APOE^{-/-} 小鼠饲喂西方饮食饲料; A~D: 雄鼠; A1~D1: 雌鼠。图中箭头指的是主动脉弓根部斑块。

图 3 各组主动脉弓根部切片和 HE 染色

Note. A/A1, C57BL/6J mice in breeding feed group. B/B1, C57BL/6J mice in Western dietary feed group. C/C1, APOE^{-/-} mice in breeding feed group. D/D1, APOE^{-/-} mice in Western dietary feed group. A~D, Male mice. A1~D1, Female mice. The arrows in the figure refer to the root plaque of the aortic arch.

Figure 3 Root section and HE staining of aortic arch in each group

表 4 各组主动脉大体油红 O 染色数据

Table 4 Aorta macroscopic oil red O staining data of each group

分组 Groups	血管面积/mm ² Vascular area	斑块面积/mm ² Plaque area	斑块面积/血管面积 Vascular area/plaque area
C57BL/6J ♂ 普通繁殖料 C57BL/6J male mice fed with breeding feed	50434.67±2534.49	0.00±0.00	0.00±0.00
C57BL/6J ♀ 普通繁殖料 C57BL/6J female mice fed with breeding feed	45432.83±3837.65	0.00±0.00	0.00±0.00
C57BL/6J ♂ 西方饮食饲料 C57BL/6J male mice fed with Western dietary feed	48565.70±4331.15	0.00±0.00	0.00±0.00
C57BL/6J ♀ 西方饮食饲料 C57BL/6J female mice fed with Western dietary feed	459289.40±4004.44	0.00±0.00	0.00±0.00
APOE ^{-/-} ♂ 普通繁殖料 APOE ^{-/-} male mice fed with breeding feed	49967.00±3112.71	888.17±817.02	1.78±1.76 [*]
APOE ^{-/-} ♀ 普通繁殖料 APOE ^{-/-} female mice fed with breeding feed	49133.50±4439.59	738.50±601.57	1.59±1.64 [*]
APOE ^{-/-} ♂ 西方饮食饲料 APOE ^{-/-} male mice fed with Western dietary feed	53321.17±2271.01	7023.83±1391.80	13.19±2.82 [#]
APOE ^{-/-} ♀ 西方饮食饲料 APOE ^{-/-} female mice fed with Western dietary feed	46093.83±3197.37	4951.50±3276.36	10.82±7.97 [#]

注: 斑块面积/血管面积, 相同性别, 相同饲料 APOE^{-/-} 组与 C57BL/6J 组相比, *P<0.05; APOE^{-/-} 同性别不同饲料组相比, #P<0.05。

Note. Plaque to vascular area ratio, compared between same sex of C57BL/6J and APOE^{-/-} feed with common feed, *P<0.05. Compared between same sex of APOE^{-/-} feed with different feed, #P<0.05.

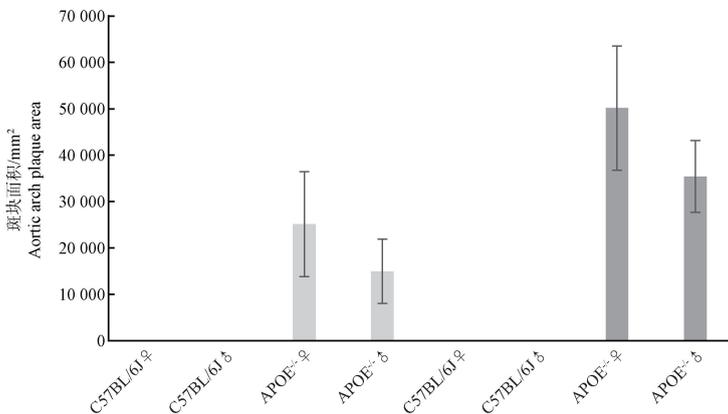


图 4 各组主动脉弓根部斑块面积比较

Figure 4 Comparison of the plaque area of the aortic arch root in each group

表 5 各组主动脉弓根部斑块面积

Table 5 Plaque area of the aortic arch root in each group

分组 Groups	斑块面积/mm ² Plaque area
C57BL/6J ♂ 普通繁殖料 C57BL/6J male mice fed with breeding feed	0.00±0.00
C57BL/6J ♀ 普通繁殖料 C57BL/6J female mice fed with breeding feed	0.00±0.00
C57BL/6J ♂ 西方饮食饲料 C57BL/6J male mice fed with Western dietary feed	0.00±0.00
C57BL/6J ♀ 西方饮食饲料 C57BL/6J female mice fed with Western dietary feed	0.00±0.00
APOE ^{-/-} ♂ 普通繁殖料 APOE ^{-/-} male mice fed with breeding feed	14973.33±6906.93
APOE ^{-/-} ♀ 普通繁殖料 APOE ^{-/-} female mice fed with breeding feed	25136.67±11293.06
APOE ^{-/-} ♂ 西方饮食饲料 APOE ^{-/-} male mice fed with Western dietary feed	35403.17±7722.12 ^{##}
APOE ^{-/-} ♀ 西方饮食饲料 APOE ^{-/-} female mice fed with Western dietary feed	50151.50±13385.02 ^{##+}

注: 斑块面积, 不同饲料, APOE^{-/-} 同性别小鼠主动脉弓根部相同部位斑块面积比较, ^{##}*P*<0.01; 相同饲料, APOE^{-/-} 异性小鼠主动脉弓根部相同部位斑块面积比较, ⁺*P*<0.05。

Note. Plaque area at the same root of aortic arch compared between same sex of APOE^{-/-} fed with different feed, ^{##}*P*<0.01. Plaque area at the same root of aortic arch compared between different sex of APOE^{-/-} fed with same feed, ⁺*P*<0.05.

3 讨论

有报道称 APOE 是一种糖蛋白, 分子大小约为 34 kDa, 作为低密度脂蛋白受体家族成员的配体, 能够清除乳糜微粒和极低密度脂蛋白残体^[6]。从血生化结果看, 不论是普通繁殖料组还是西方饮食饲料组 APOE^{-/-} 小鼠低密度脂蛋白都显著高于普通繁殖料 C57BL/6J 组低密度脂蛋白指标。还有报道指出 APOE^{-/-} 小鼠正常饮食即可达到较高血浆总胆固醇水平 (400~600 mg/dL), 为野生型小鼠的 4~5 倍^[2], 根据血生化检测结果分析, 确实与文献报道相符。有报道指出 APOE^{-/-} 小鼠血浆三酰甘油含量明显升高^[7], 但是本研究未发现 APOE^{-/-} 小鼠总甘油三酯显著增加。APOE^{-/-} 小鼠自发出现血清血脂指标紊乱 (TG、CHOL、LDL-C 升高, HDL-C 明显降低), 给予高脂饮食后进一步加重, 且肝功能损伤 (AST、ALT、ALP 显著升高)^[8], 本研究表明西方饮食促进 APOE^{-/-} 小鼠 AST 的升高, 但是 ALT 和 ALP 未见显著升高。文献报道血清心肌酶和肾功能指标未见明显变化 (ALB、CREA、UREA)^[8], 本研究表明西方饮食确实对 ALB 指标影响不显著。

有报道指出 12 月龄 APOE^{-/-} 小鼠心脏和肝无明显病变, 而肾出现肾小球肿胀, 肾小囊变小等病变, 尿素氮 (UN)、肌酐 (Cr) 和尿酸 (UA) 明显升高, 雌性血压出现升高^[9]。分析西方饮食没有明显增加 UA 可能与 APOE^{-/-} 小鼠发病进程和月龄有关。观察 20 周 APOE^{-/-} 和 C57BL/6J 各组小鼠血生化指标, 可见普通繁殖饲料 APOE^{-/-} 雌鼠尿酸显著高于

西方饮食 APOE^{-/-} 雌鼠, 普通繁殖饲料 C57BL/6J 小鼠白蛋白、尿酸指标显著高于普通繁殖饲料 APOE^{-/-} 小鼠 (同性别比较), 可能与饮食影响血液浓缩有关。

APOE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化 (AS) 病变部位涉及主动脉根、主动脉弓、头臂干动脉及其分支、颈动脉、胸主动脉、腹主动脉、腹主动脉叉、髂总动脉、股动脉、肠系膜上动脉及其分支、肾动脉、肺动脉、冠状动脉近端, 但以主动脉根为主。饲喂普通饲料的 APOE^{-/-} 小鼠主动脉根部在 10 周时出现黄白色结节, 内皮下泡沫细胞聚积, 以及单核细胞与内皮细胞的粘附, 15 周时出现中度病变, 表现为梭状的平滑肌细胞与泡沫细胞相互混杂, 并有少许结缔组织基质沉积; 20 周后出现纤维斑块。西方饮食则会加速 AS 病变进程, 导致小鼠出现更多晚期病变, 病变处胆固醇结晶、坏死核和钙化更明显, 老龄 APOE^{-/-} 小鼠可发生斑块内出血尤其是头臂干动脉处^[2]。本研究从 3 周开始饲喂, 直到 20 周结束研究。通过分析主动脉斑块面积与血管面积的比值, 可以确定 APOE^{-/-} 雄鼠比 APOE^{-/-} 雌鼠斑块面积与血管面积比值更大, 但是差异不显著 (*P*>0.05)。

本研究对主动脉弓根部进行了石蜡切片和 HE 染色, 通过分析相同部位主动脉弓根部石蜡切片斑块面积数据, 发现西方饮食可显著增加 APOE^{-/-} 雄鼠和雌鼠的斑块面积 (*P*<0.05)。相同饲料, 不同性别 APOE^{-/-} 小鼠斑块面积比较, 普通饲料组不同性别 APOE^{-/-} 小鼠未见差异 (*P*>0.05), 西方饮食饲料组雌性 APOE^{-/-} 小鼠比雄性 APOE^{-/-} 小鼠斑块面积

大($P<0.05$)。

综合生化数据中对雌鼠和雄鼠甘油三酯、总胆固醇和低密度及高密度脂蛋白的分析,笔者认为用 APOE^{-/-}雄鼠造主动脉大体斑块比较合适。用 APOE^{-/-}雌鼠造主动脉弓根部斑块较合适,具体发生原因可能和雌雄不同性别生理特点有关,还需进一步研究。

有报道指出低密度脂蛋白日久发动动脉血栓、斑块破裂、钙化结节等严重不良事件^[8]。血管内壁分布了丰富的免疫细胞,低密度脂蛋白在血管内壁集聚,容易被氧化或修饰以及血管内皮损伤引起的炎症反应,触发先天和获得性免疫反应,可能是促进斑块形成的主要原因^[10]。西方饮食饲料可以增加 2~3 倍 LDL 值。主要是西方饮食饲料中没有粮食和鱼粉等常规原料,取而代之的是蛋氨酸、玉米淀粉、麦芽糊精、蔗糖、胆碱等原料。油脂以奶油为主,高蛋氨酸(Met)摄入在动脉粥样硬化发展过程中起着重要作用,随着基因组表观遗传学研究的深入,DNA 甲基化修饰成为动脉粥样硬化发病机制之一,高 Met 膳食促动脉粥样硬化的原因可能是 S-腺苷同型半胱氨酸通过影响基因甲基化从而影响动脉粥样硬化相关基因的表达,最终引起动脉粥样硬化的发生和发展^[10]。酒石酸胆碱是一种营养增补剂及祛脂剂,它能促进脂肪的代谢,防止脂肪在肝中的积累。玉米淀粉促进 LDL 的提高^[11],麦芽糊精和蔗糖进入体内促进生糖,导致 TG 升高。奶油含有中等含量不饱和脂肪酸,而饱和脂肪的摄入是影响 LDL 水平的主要因素^[12]。

综上所述,西方饮食饲料从 3 周饲喂到 20 周明显加速 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的造模,促进主动脉斑块和主动脉弓根部斑块形成。

参考文献:

[1] 李浩,张琪. 动脉粥样硬化小鼠模型应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 787-794.
LI H, ZHANG Q. Progress in the application of arteriosclerosis mouse models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 787-794.

[2] NAKASHIMA Y, PLUMP A S, RAINES E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14(1): 133-140.

[3] ZHANG S H, REDDICK R L, BURKEY B, et al. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption [J]. J Clin Invest, 1994, 94:

937-945.

[4] 宋珂,侯彦宏,杨会,等. ApoE 基因敲除小鼠疾病模型的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(18): 42-44, 48.
SONG K, HOU Y H, YANG H, et al. Advances in research on disease model of ApoE knockout mice [J]. China Med Her, 2019, 16(18): 42-44, 48.

[5] WANG S Z, WU M, CHEN K J, et al. Hawthorn extract alleviates atherosclerosis through regulating inflammation and apoptosis related factors: an experimental study [J]. Chin J Integr Med, 2018, 25(2): 108-115.

[6] GETZ G S, REARDON C A. Apoprotein E and reverse cholesterol transport [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3479.

[7] 季丹,黄大可,桂丽,等. ApoE 基因敲除小鼠海马 CA3 区神经元形态学和微管相关蛋白 2 表达变化 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(11): 1600-1603.
JI D, HUANG D K, GUI L, et al. Neuronal morphology and microtubule associated protein 2 expression changes in ApoE knockout mice hippocampal CA3 area [J]. Acta Univ Med Anhui, 2016, 51(11): 1600-1603.

[8] 李南,杨安宁,孙岳,等. 高脂饮食对 ApoE^{-/-}小鼠血清生化指标的影响 [J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(8): 876-878, 882.
LI N, YANG A N, SUN Y, et al. Effect of high-fat diet on blood biochemical indexes in ApoE^{-/-} mice [J]. J Ningxia Med Univ, 2016, 38(8): 876-878, 882.

[9] 田枫,张阔,康爱君,等. 12 月龄 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠心脏、肝脏和肾脏病变的特点 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(2): 190-192.
TIAN F, ZHANG K, KANG A J, et al. Characteristics of heart, liver and kidney lesions in 12-month-old ApoE^{-/-} atherosclerotic mice [J]. Chin J Gerontol, 2010, 30(2): 190-192.

[10] 李然,刘建勋,李磊,等. 不同饲料配方对大鼠 TC, LDL-C, Hcy 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 207-210.
LI R, LIU J X, LI L, et al. Effect of different feeds on TC, LDL-C, Hcy in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(9): 207-210.

[11] 张珍珍,尹富贵,黄菊,等. 不同消化速率的淀粉对断奶仔猪脂肪代谢相关血清生化指标的影响 [J]. 营养学报, 2010, 32(2): 105-108, 112.
ZHANG Z Z, YIN F G, HUANG J, et al. Effect of starches with different digestion rates on serum biochemical parameters of lipid metabolism in weaning pig [J]. Acta Nutr Sin, 2010, 32(2): 105-108, 112.

[12] 徐红华,王明丽. 膳食脂肪对心血管疾病的影响 [J]. 中国食物与营养, 2001, 7(1): 44-45.
XU H H, WANG M L. Effect of dietary fat on cardiovascular diseases [J]. Food Nutr China, 2001, 7(1): 44-45.